

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003年9月4日 (04.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/072142 A1

(51) 国際特許分類:  
A61K 51/00, 9/127,  
47/20, 47/22, A61P 35/00

A61K 51/00, 9/127,

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号  
京橋日建ビル8階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02034

(22) 国際出願日: 2003年2月25日 (25.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-49037 2002年2月26日 (26.02.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 天藤製  
薬株式会社 (AMATO PHARMACEUTICAL PROD-  
UCTS, LTD.) [JP/JP]; 〒620-0932 京都府 福知山市 笹  
尾町9-5-5 Kyoto (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,  
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ,  
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,  
ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI  
特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 荒野 泰  
(ARANO, Yasushi) [JP/JP]; 〒263-0043 千葉県 千葉  
市 稲毛区 小仲台 7-3-1 アクアフォレスト  
ルネ稲毛アクア棟 1315 Chiba (JP). 金子 恵美  
(KANEKO, Emi) [JP/JP]; 〒263-0021 千葉県 千葉市  
稲毛区 轟町 2-2-6-203 Chiba (JP). 村上 正裕  
(MURAKAMI, Masahiro) [JP/JP]; 〒547-0026 大阪府  
大阪市 平野区 喜連西 3-17-6 Osaka (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ENCAPSULATING METAL COMPLEX WITHIN LIPOSOMES

(54) 発明の名称: リポソームへの金属錯体の封入方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of constructing liposomes having a complex of a metal radioactive nuclear seed having a short half-life (for example, <sup>99m</sup>Tc) and CD encapsulated therein at a practically available radiochemical yield and purity. Namely, a method of producing liposomes having a short half-life metal radioactive nuclear seed and ethylenedicycysteine (CD) encapsulated therein which comprises mixing a complex of the short half-life metal radioactive nuclear seed and N-[2(1H-pyrrolyl-methyl)]-N'-(4-penten-3-one-2)ethane-1,2-diamine and liposomes having ethylenedicycysteine (CD) encapsulated therein and incubating the same is provided.

(57) 要約: 本発明の目的は、実用化の可能な放射化学的収率と純度で<sup>99m</sup>Tcなどの短半減期金属放射性核種とCDとの錯体を封入したリポソームを製する方法を提供することである。本発明によれば、短半減期金属放射性核種とN-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとの錯体と、エチレンジスチン (CD) 封入リポソームとを混合し、インキュベートすることを含む、短半減期金属放射性核種とエチレンジスチン (CD) との錯体を封入したリポソームの製造方法が提供される。

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/072142 A1

## 明細書

## リボソームへの金属錯体の封入方法

## 技術分野

本発明は、 $^{99m}\text{Tc}$ などの短半減期金属放射性核種とエチレンジス테인(CD)との錯体を封入したリボソームの製造方法に関する。より詳細には、 $\text{N}-[2(1\text{H-ピロリルメチル})]-\text{N}'-(4\text{-ペンテン-3-オン-2})\text{エタン-1,2-ジアミン}$ を配位させた $^{99m}\text{Tc}$ などの短半減期金属放射性核種の錯体を用いた、 $^{99m}\text{Tc}$ などの短半減期金属放射性核種の錯体を封入したリボソームの製造方法、該方法で製造されたリボソーム、該方法で使用するための試薬キットに関する。

## 背景技術

放射性核種を用いた癌の画像診断は、非侵襲的な早期診断を可能とする。画像診断に汎用されるラジオアイソトープ(RI)のうち、金属RIであるテクネチウム-99m( $^{99m}\text{Tc}$ )は、画像診断に適切な半減期(6時間)と $\gamma$ 線のエネルギー(141keV)を有し、さらに $^{99}\text{Mo}$ を親核種とするジェネレーターシステムにより生理食塩水溶液として容易に入手可能であるため、臨床応用に最も適した核種である。 $^{99m}\text{Tc}$ を腫瘍へ選択的に送達する目的で、標識母体に抗体やペプチドを用いる研究がこれまで多くなされているが、リボソームも画像診断への利用が検討されてきたキャリアのひとつである。リボソームは、脂質二分子膜で構成される閉鎖小胞であり、化学療法剤などの薬物、タンパク質、核酸などのカプセル型DDSキャリアとして注目されている。核医学診断においても、内部に大量の放射能を内包でき、粒子径の調節や膜表面の化学修飾により標的指向化が可能であることから、 $^{99m}\text{Tc}$ で標識したリボソームは固形癌のほか、センチネルリンパ節や、炎症・感染部位の高感度画像診断への応用が期待される。

腫瘍組織では血管透過性が亢進しており、またリンパ系を介する回収が欠如しているため、高分子が血中から腫瘍組織間質へ漏出し、蓄積しやすいことが明ら

かになっている。また、このような特性から組織間質に透過したリポソームは、腫瘍組織内において、細胞内へ取り込まれることなく細胞間質に存在することが示唆されている。しかし血流を循環するリポソームは、主に肝臓、脾臓などの細網内皮系組織に捕捉され、血中から除去される。これまでよく検討されてきた同じく腫瘍の画像診断を目的とした $^{67}\text{Ga}$ および $^{111}\text{In}$ のnitrilotriacetic acid (NTA) 錯体を封入したリポソームは、実験動物において優れた腫瘍集積性を示すものの、肝臓や脾臓への高い放射能集積も認められ、実用化への大きな障害となっている。肝臓や脾臓に取り込まれたリポソームは、実質細胞内のリソソームと融合し代謝されるが、このときリソソーム内に放出された封入錯体 $^{67}\text{Ga}$ および $^{111}\text{In}$ -NTAは水溶性であるため膜を透過できず、またその低い安定性から錯体が分解し、リソソーム内に放射性核種が貯留する。その結果、これらの組織内に長時間にわたる放射能の滞留を示すと考えられる。

そこでリポソームが細胞内リソソーム内に取り込まれ、代謝を受けた後に放出されるRI錯体に、リソソームから血中へ移行し、速やかに尿中へと排泄される性質を付与することで、これらの非特異的な放射能滞留を解消されたと考えた。このような性質を有する錯体として $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ethylene dicysteine ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CD) (図1.)を選択した。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CDは2分子の遊離カルボン酸と安定な5価中性錯体構造を有し、パラアミノ馬尿酸と同様に、腎臓の有機アニオントランスポータを介して、安定な化学形で尿排泄されることが報告されている。本発明者らのこれまでの研究によれば、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ と同族の長半減期金属放射性核種であるレニウム-186 ( $^{186}\text{Re}$ )のCD錯体、 $^{186}\text{Re}$ -CDをリポソーム内に封入することで、肝臓や脾臓に集積する放射能を $^{186}\text{Re}$ -CDとして速やかに尿中へ排泄し、これらの臓器の放射能滞留を大きく低減できることが明らかになっている。これらの結果は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CD錯体封入リポソームも同様に、肝臓や脾臓での放射能滞留の解消が可能であることを示唆している。

しかし、 $^{186}\text{Re}$ -CDリポソーム作製時、脂質に $^{186}\text{Re}$ -CD錯体をそのまま添加して膨潤させる直接封入では、封入効率は3.2%と著しく低かったことから、 $^{186}\text{Re}$ -CD

または  $^{99m}\text{Tc}$ -CD のリポソームへの封入法の確立が必要とされる。また、臨床で使用する際は、直接封入リポソームは使用直前にリポソームを調製する必要があり、実用性の面からもあらかじめ調製したリポソームを臨床で標識する方法が望ましい。 $^{67}\text{Ga}$  や  $^{111}\text{In}$  の効率的かつ簡便な封入法として、高い脂溶性と置換活性を有する錯体である  $^{67}\text{Ga}$  および  $^{111}\text{In}$ -oxine 錯体を作製し、NTA 内包リポソームとインキュベートすることにより、リポソーム膜を透過した錯体が内部で配位子交換反応を起こし、水溶性キレートである  $^{67}\text{Ga}$  および  $^{111}\text{In}$ -NTA としてリポソーム内に保持させる手法が報告されている (図 2)。配位子交換反応と呼ばれるこの封入法を用いた場合、 $^{67}\text{Ga}$  や  $^{111}\text{In}$  の封入効率は約 90% に達する。また、 $^{99m}\text{Tc}$  標識リポソームを高い放射化学的収率で得る方法として、脂溶性錯体である  $^{99m}\text{Tc}$ -hexamethyl propyleneamine oxime ( $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO) を、グルタチオン内包リポソームとインキュベートすることにより、内部で  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO を還元的に水溶性分解物に変換させる。封入効率はおよそ 60% から 90% であり、最近では核医学的に用いられる RI 標識リポソームは、この封入法によって調製されるものがもっとも一般的であるが、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$  および  $^{99m}\text{Tc}$  のいずれの標識リポソームにおいても、前述のような肝臓・脾臓への放射能滞留の問題が生じる。

#### 発明の開示

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、投与した放射能が速やかに排泄されるためには、高い封入効率のみでなく、内部の  $^{99m}\text{Tc}$ -CD の放射化学的純度を十分に向上させることも同時に必要である。従って、本発明の目的は、実用化の可能な放射化学的収率と純度で  $^{99m}\text{Tc}$  などの短半減期金属放射性核種と CD との錯体を封入したリポソームを作製する方法を提供することである。

本発明者らは上記課題を解決することを目的として、高い膜透過性と置換活性を有する 2 種の  $^{99m}\text{Tc}$  錯体である  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO と  $^{99m}\text{Tc}$ -N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミン (MRP20) (図 3) を配位子

交換反応において利用し、両者を比較検討した。また、作製した  $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームの体内放射能動態を検討し、 $^{99m}\text{Tc}$  による画像診断および  $^{186}\text{Re}$  による内用放射線治療に対する本標識法の有用性について評価した。その結果、 $^{99m}\text{Tc}$ -N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミン ( $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20) を用いて配位子交換反応により  $^{99m}\text{Tc}$ -CD をリボソームに封入することにより、肝臓や脾臓への非特異的放射能滞留を解消する  $^{99m}\text{Tc}$  封入リボソームを作製することが可能であることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、短半減期金属放射性核種と N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとの錯体と、エチレンジステイン (CD) 封入リボソームとを混合し、インキュベートすることを含む、短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン (CD) との錯体を封入したリボソームの製造方法が提供される。

好ましくは、 $^{99m}\text{Tc}$ -N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとエチレンジステイン (CD) 封入リボソームとを混合し、インキュベートすることを含む、 $^{99m}\text{Tc}$ -エチレンジステイン (CD) 錯体封入リボソームの製造方法が提供される。

本発明の別の側面によれば、短半減期金属放射性核種と N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとの錯体と、エチレンジステイン (CD) 封入リボソームとを混合し、インキュベートすることにより製造される、短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン (CD) との錯体を封入したリボソームが提供される。

好ましくは、 $^{99m}\text{Tc}$ -N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとエチレンジステイン (CD) 封入リボソームとを混合し、インキュベートすることにより製造される、 $^{99m}\text{Tc}$ -エチレンジステイン (CD) 錯体封入リボソームが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記したリボソームを含む、診断剤又は治



療剤が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、1種類以上のリボソーム形成物質；エチレンジス테인 (CD)；エチレンジス테인 (CD) 封入リボソーム；短半減期金属放射性核種；N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミン；または、短半減期金属放射性核種と N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとの錯体；から成る群から選択される少なくとも1種類以上の物質を含む、本発明による短半減期金属放射性核種とエチレンジス테인 (CD) との錯体を封入したリボソームの製造方法を行うための試薬キットが提供される。

好ましくは、短半減期金属放射性核種は、 $^{99m}\text{Tc}$  またはその塩である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、 $^{99m}\text{Tc}$ -CD の推定構造を示す。CD は配位原子に窒素とイオウを有し、5価の  $^{99m}\text{Tc}$  と、安定なオキソ錯体を形成する。

図2は、 $^{86}\text{Re}$ -CD 直接封入法 (A) と、 $^{111}\text{In}$ -NTA の配位子交換反応 (B) を示す。

■：CD または NTA

▲： $^{86}\text{Re}$  または  $^{111}\text{In}$

○：オキシン

図3は、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO (左) と、 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 (右) の構造を示す。高い脂溶性と置換活性を持つ  $^{99m}\text{Tc}$  錯体であり、比較的容易に加水分解および配位子交換反応を起こすと考えられる。

図4は、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO および  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 の水溶液中での安定性を示す。錯体形成0時間後を100%としたときの、各  $^{99m}\text{Tc}$  錯体の放射化学的純度の時間変化を表す。

- (A) RP-HPLC 未精製の  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO；
- (B) RP-HPLC 精製後の  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO；
- (C) RP-HPLC 未精製の  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20；
- (D) RP-HPLC 精製後の  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20；

○ : 25°C, □ : 37°C

図5は、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO (A) および  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 (B) と CD の配位子交換反応性の pH による影響を示す。交換反応によって生じた  $^{99m}\text{Tc}$ -CD の放射化学的吸収率を縦軸に表す。

○ : RP-HPLC 未精製の  $^{99m}\text{Tc}$  錯体との交換 ;

□ : RP-HPLC 精製後の  $^{99m}\text{Tc}$  錯体との交換 ;

図6は、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO を用いて調製した  $^{99m}\text{Tc}$ -CD リポソーム ( $^{99m}\text{Tc}$ (HMPAO)-CD リポソーム) の内容物の EP 分析結果を示す。

図7は、 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 を用いて調製した  $^{99m}\text{Tc}$ -CD リポソーム ( $^{99m}\text{Tc}$ (MRP20)-CD リポソーム) の内容物の EP 分析結果 (A) と RP-HPLC 分析結果 (B) を示す。

図8は、 $^{99m}\text{Tc}$  標識リポソームをマウスに静脈投与したときの体内放射能動態を示す。

△ :  $^{99m}\text{Tc}$ /GSH リポソーム ;

■ :  $^{99m}\text{Tc}$ (HMPAO)-CD リポソーム ;

● :  $^{99m}\text{Tc}$ (MRP20)-CD リポソーム ;

図9は、 $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リポソームをマウスに投与後、対外排泄された放射能の投与放射能に対する割合を示す。

■ :  $^{99m}\text{Tc}$ (HMPAO)-CD リポソーム投与群 ;

□ (斜線) :  $^{99m}\text{Tc}$ (MRP20)-CD リポソーム投与群 ;

図10は、 $^{99m}\text{Tc}$ (MRP20)-CD リポソームをマウスに投与後、尿中排泄された放射能の EP (A) と RP-HPLC (B) での分析結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明により提供される、短半減期金属放射性核種とエチレンジス테인 (C D) との錯体を封入したリポソームの製造方法は、短半減期金属放射性核種と N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンと

の錯体と、エチレンジス테인 (CD) 封入リポソームとを混合し、インキュベートすることを特徴とするものである。

本発明で用いることができる短半減期金属放射性核種の種類は特に限定されないが、好ましくは、 $^{99m}\text{Tc}$  (テクネシウム 99m)、または  $^{186/188}\text{Re}$  であり、特に好ましくは、 $^{99m}\text{Tc}$  である。

本発明で用いる短半減期金属放射性核種と N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミン (MRP20) との錯体は、例えば、短半減期金属放射性核種が  $^{99m}\text{Tc}$  である場合には、MRP20 のエタノール溶液と塩化第一スズの塩酸溶液を混和し、これに  $^{99m}\text{TcO}_4$  溶液を加え室温で放置することにより製造することができる。 $^{99m}\text{Tc}$  以外の短半減期金属放射性核種を使用する場合には、 $^{99m}\text{TcO}_4$  溶液の代わりに、対応する短半減期金属放射性核種を含有する溶液を使用すればよい。

本発明で用いるエチレンジス테인 (CD) 封入リポソームは、リポソーム形成物質を用いて常法により製造することができる。

リポソーム形成物質は、当分野で通常使用されるものであれば特に限定されないが、生体内において安定なリポソームを提供するという点から、リン脂質あるいはその誘導体、リン脂質以外の脂質あるいはその誘導体が好適に用いられる。

前記リン脂質は、例えば、リン脂質は、例えば、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレイルホスファチジルコリン、ホスファチジルコリン (レシチン)、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、カルジオリピン、大豆レシチン、卵黄レシチン、等の天然または合成のリン脂質、あるいはこれらを常法に従って水素添加したものが挙げられる。

さらに、親水性高分子の脂質誘導体を添加してリポソームの表面を修飾することもできる。使用することができる親水性高分子の脂質誘導体としては、リポソームの構造安定を損なうものでなければ特に限定されず、例えば、ポリエチレン



グリコール、デキストラン、プルラン、フィコール、ポリビニルアルコール、合成ポリアミノ酸、アミロース、アミロペクチン、マンナン、シクロデキストリン、ペクチン、カラギーナン、及びこれらの誘導体などが挙げられ、特に好ましくは、ポリエチレングリコールおよびポリエチレングリコール誘導体を使用することができる。

本発明で用いるリポソームには、必要に応じ、安定化剤、酸化防止剤等を用いることも可能である。安定化剤は、例えば、膜流動性を低下させるコレステロール等のステロール；グリセロール、シュクロース等の糖類が挙げられる。酸化防止剤は、例えば、トコフェロール同族体、例えば、ビタミンEなどが挙げられる。

リポソームを製造するためには、フラスコ中で溶媒に溶解したリポソーム形成物質（２種類以上の混合物でもよい）を、減圧下で溶媒を留去することにより、フラスコ内壁に脂質の薄膜を形成させることができる。

溶媒としては使用する脂質を溶解し得るものが何れも使用でき、例えば、クロロホルム、メチルクロロホルム、塩化メチレン等のハロゲン化炭化水素類、ヘキサン、ヘプタン等の炭化水素類、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、エチレングリコールジメチルエーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル類等を挙げることができる。

次いで、減圧デシケーターに移し減圧下で溶媒を完全に留去した後、CD水溶液を添加し、脂質を膨潤させ、懸濁液として多重膜リポソーム (MLV) を得ることができる。さらに、 $0.2\mu\text{m}$ 、 $0.05\mu\text{m}$  などのメンブランフィルターを用いて順次加圧ろ過することにより、単膜リポソームを得ることができる。

得られたリポソーム分散液は、ゲル濾過、遠心分離等の公知の方法に準じて精製することによって、リポソームとリポソームに内封されなかった物質とを分離することができる。

次いで、上記で得られたエチレンジステイン (CD) 封入リポソームに、短半減期金属放射性核種と  $\text{N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミン}$  との錯体（特に好ましくは、 $^{99\text{m}}\text{Tc-N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミン}$ ）とを封入することができる。

ル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンなど)を添加して、インキュベートすることにより、短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン(CD)との錯体を封入したリボソームを製造することができる。インキュベートの温度および時間は特に限定されず、適宜設定することができる。例えば、室温で30分から数時間程度インキュベートすることにより、短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン(CD)との錯体を封入したリボソームを製造することができる。

上記した本発明の方法で得られる短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン(CD)との錯体を封入したリボソームは、短半減期金属放射性核種(例えば、 $^{99m}\text{Tc}$ )-CD錯体の純度が高いことを特徴とする。このようにリボソーム内部の短半減期金属放射性核種(例えば、 $^{99m}\text{Tc}$ )-CD錯体の放射化学的純度が高いほど、肝臓や脾臓からの速やかな放射能消失が期待できるため、本発明の方法で製造される短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン(CD)との錯体を封入したリボソームは、従来の $^{99m}\text{Tc}$ 封入リボソームや $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-CDリボソームよりも大幅に肝臓や脾臓での放射能滞留が低減しているという特徴を有している。このような特徴を有するリボソーム自体も本発明の範囲内に属する。

本発明の方法で得られる短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン(CD)との錯体を封入したリボソームは、例えば、癌または腫瘍などを含む各種疾患の診断剤または治療剤として有用である。

本発明のリボソームは、経口または非経口投与により生体に投与することができる。投与法は、注射による投与が好ましく、癌または腫瘍の存在部位により静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、動脈内注射などの何れも用いることができるが、好ましくは静脈内注射である。

本発明のリボソームを診断剤または治療剤として投与する場合、リボソームをそのまま投与してもよいが、リボソームを含む医薬組成物の形態で投与することが好ましい。前記医薬組成物は、本発明のリボソームおよび薬学的に許容される賦形剤を含み、必要に応じて、他の薬学的製剤、担体、補助薬等を含んでいても

よい。

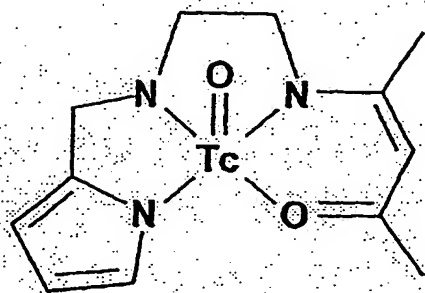
本発明のリポソームを注射により被験者に投与する場合、液体の医薬組成物を調製することが好ましい。

液体の医薬組成物は、例えば、本発明のリポソームを、水、生理食塩水、水性ブドウ糖、グリセロール、グリコール、エタノール等のような担体中に、必要に応じてアジュバントを添加して、溶解または分散させることにより、溶液または懸濁液として調製することができる。

また、本発明の医薬組成物には、所望により、湿潤剤、乳化剤、または可溶化剤、pH緩衝剤等、例えば、アセテート、クエン酸ナトリウム、シクロデキストリン誘導体、一ラウリン酸ソルビタン、酢酸トリエタノールアミンナトリウム、オレイン酸トリエタノールアミン等のような助剤を少量含有させてもよい。このような医薬組成物の調製方法は、当業者に自明である。

本発明のリポソームの投与量は、投与の目的、封入された短半減期金属放射性核種の種類や封入量などにより異なるが、通常成人に対し0.1mg～1g程度投与される。

さらに、本発明では、下記式：



で表される  $^{99m}\text{Tc-N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミン}$  ( $^{99m}\text{Tc-MRP20}$ ) を使用する。

$^{99m}\text{Tc-MRP20}$  は、 $\text{N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミン}$  (MRP20) のエタノール溶液と塩化第一スズの塩酸溶液を混和し、

これに<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>溶液を加え室温で放置することにより製造することができる。

さらに、本発明によれば、1種類以上のリポソーム形成物質；エチレンジステイン (CD)；エチレンジステイン (CD) 封入リポソーム；短半減期金属放射性核種；N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミン；または、短半減期金属放射性核種と N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとの錯体から成る群から選択される少なくとも1種類以上の物質を含む、短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン (CD) との錯体を封入したリポソームの製造方法を行うための試薬キットが提供される。

上記において、1種類以上のリポソーム形成物質、及びエチレンジステイン (CD) は、エチレンジステイン (CD) 封入リポソームを製造するための試薬であり、これらの単独又は両方を試薬キットに含めてもよいし、あるいは製造後のエチレンジステイン (CD) 封入リポソーム自体を試薬キットに含めてもよい。

同様に、短半減期金属放射性核種、及び N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンは、短半減期金属放射性核種と N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとの錯体を製造するための試薬であり、これらの単独または両方を試薬キットに含めてもよいし、あるいは製造後の短半減期金属放射性核種と N-[2(1H-ピロリルメチル)]-N'-(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとの錯体を試薬キットに含めてもよい。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

## 実施例

### (実験材料と方法)

#### 1. 一般的方法

<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>溶液は、<sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc ジェネレーター (Ultra Technic Kow, 第一アイソト

ープ)の生理食塩水溶出液を用いた。錯体合成における生成物の確認は、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ペーパークロマトグラフィー (PC)、セルロースアセテート膜電気泳動法 (EP) および逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いた。TLC は Merck 社製シリカゲル (Silica gel 60 F<sub>254</sub>) を使い、クロロホルムとメタノールの混合溶媒 (4:1) で展開した。PC は Whatman 社製ろ紙 (No. 1) を使い、50%アセトニトリルで展開した。EP は、泳動膜にセルロースアセテート膜 (SELECA-V, 東洋濾紙会社)、緩衝液にベロナール緩衝液 (pH=8.6, I=0.06, ナカライテスク) を使用し、一定電流 (1mA/cm) で 25 分間泳動した。RP-HPLC はカラムに COSMOSIL C<sub>18</sub>-AR-300 (4.6mm×150mm, ナカライテスク) を用いてこれにフラクションコレクター (Pharmacia) を接続し、採取した全フラクションをガンマカウンター (ARC-380M, Aloka) で測定した。標識化合物の分析は、流速を 0.5ml/min、移動相は (A) 0.01M リン酸緩衝液 (pH=7.0) とアセトニトリルを用いて、アセトニトリルの割合が 10 分で 0~100%になる測定条件、(B) 0.0125M リン酸緩衝液 (pH=2.5) とアセトニトリルを用いて、アセトニトリルの割合が 12 分で 0~9%、20 分から 40 分で 9~100%になる測定条件で行った。

## 2. CD および MRP20 の合成

N,N'-ethylene dicysteine (CD) の合成は Brondeau らの方法に準じて行った (Blondeau et al. Canadian J Chem 45:49-52, 1967)。L-thioprolin (thiazolidine-4-carboxylic acid, 東京化成) のアンモニア溶液に金属ナトリウムを加え攪拌した後、NH<sub>4</sub>Cl を加え室温で一晩攪拌し、生成した結晶を水に溶解し塩酸で析出させて得た (収率 23%, 融点 251-254℃)。

N-[2(1H-pyrrolylmethyl)]-N'-(4-pentene-3-one-2)ethane-1,2-diamine (MRP20) の合成は Morgan らの方法に準じて行った (Morgan et al. Inorg. Chim. Acta 190:257-264, 1991)。Pyrrole-2-aldehyde と ethylen diamine をアセトニトリル中で一晩攪拌後、メタノール溶媒下 NaBH<sub>4</sub> で還元し、塩基性条件でクロロホルムに抽出して中間体を得た。次いで中間体と acetyl acetone をアセトニトリル中で



攪拌後、クロロホルムで抽出し、シリカゲルカラム（溶媒は酢酸エチル：メタノール = 5:1）とベンゼンによる再結晶で精製した。収率 15.9%，融点 74-75°C（文献値 75°C）。

### 3. $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO および $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 の合成

$^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO ( $^{99m}\text{Tc}$ -hexamethyl propyleneamine oxime) は日本メジフィジックスから供給されたキット（Cerebrotec（登録商標），Nycomed Amersham International）によって調製した。キットに  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  生理食塩水溶液を加え、溶解直後に使用した。

$^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 は MRP20 のエタノール溶液 (17mM) 190  $\mu\text{l}$  と塩化第一スズの 0.01N HCl 溶液 (1.35M) 10  $\mu\text{l}$  を混和し、これに  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  溶液 200  $\mu\text{l}$  を加え室温で 15 分放置したものを使用した。

得られた  $^{99m}\text{Tc}$  錯体 ( $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO、 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 および  $^{99m}\text{Tc}$ -CD) の放射化学的収率は TLC, PC, EP, RP-HPLC により求めた。放射化学的収率の算出は、乾燥後の TLC プレート、ろ紙、およびセルロースアセテート膜を 5mm の幅に切断し、各切片をガンマカウンターで測定し、各プレート上のすべての放射能を 100% としたときのそれぞれの Rf 値における放射能の割合を求めることで行った。

### 4. HMPAO および MRP20 の分配係数の測定

オクタノール 500  $\mu\text{l}$  と、pH7.0 の HEPES 緩衝液または pH12.0 の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -NaOH 緩衝液 500  $\mu\text{l}$  に、生理食塩水で 8mM に調製した HMPAO または MRP20 溶液を 20  $\mu\text{l}$  加え、攪拌・静置した後、オクタノール層、水層の吸光度を測定し、二錯体の脂溶性を比較した。

### 5. $^{99m}\text{Tc}$ 錯体の水溶液中での安定性

$^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO と  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 の水溶液中での安定性を比較する目的で、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO 水溶液を 50mM アンモニア緩衝液 (pH9.4) で最終リガンド濃度が 1mM と

なるよう希釈し、25℃または37℃の水浴中でインキュベートし、一定時間(0.5, 2, 4, 8, 24時間)後に上述の分析法によってそれぞれの放射化学的純度を求めた。 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20水溶液は50mMリン酸緩衝液(pH8.3)で希釈し、同様の操作を行った。

また遊離リガンドの安定性への影響を検討する目的で、 $^{99m}\text{Tc}$ 錯体溶液をRP-HPLCで精製し、100%アセトニトリル中に溶出された精製 $^{99m}\text{Tc}$ 錯体溶液を緩衝液で1:1の割合で混和・希釈して、精製前と同様に、錯体の放射化学的純度の時間変化を調べた。

#### 6. $^{99m}\text{Tc}$ 錯体のCDとの配位子交換反応性

CDを1N NaOHで66.7mMとなるよう溶解した後、緩衝液で10倍に希釈し、2N HClでpHを調整したものをCD水溶液とした。このCD水溶液と $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAOおよび $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20溶液を3:1の割合で混合し、37℃で30分間インキュベート後、EPによってTc-CDの放射化学的収率を求めた。CDを希釈する緩衝液として、HEPES緩衝液pH7.0またはpH8.3、アンモニア緩衝液pH9.4または10.5、リン酸ナトリウム緩衝液pH11.2(すべて50mM)を用いた。CD溶液と $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAOおよび $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20溶液を溶液混合後のCD濃度は5mM、HMPAOおよびMRP20濃度は2mMであった。

#### 7. リボソームの調製

ナス型フラスコにクロロホルム2mlで溶解した distearoyl phosphatidylcholine (DSPC, 日本油脂)と cholesterol (CH, Sigma)をモル比として2:1 (15  $\mu\text{mole}$  : 7.5  $\mu\text{mole}$ )で混合させた後、減圧下65℃で溶媒を留去することにより、フラスコ内壁に脂質の薄膜を形成させた。減圧デシケーターに移し4時間以上減圧下で溶媒を完全に留去した後、ほぼ等張の封入物質の水溶液を添加し、65℃にて脂質を膨潤させ、懸濁液として多重膜リボソーム(MLV)を得た。0.2  $\mu\text{m}$ 、0.05  $\mu\text{m}$ のポリカーボネート・メンブランフィルター(Nuclepore (登録商標), 野村マイクロサイエンス)を用いて順次加圧ろ過をして単膜リボ

ソーム (SUV) を得た。生成したリボソームは 5% マンニトール水溶液で膨潤した Bio-Gel A-1.5m (Bio-Rad) を担体とするゲルろ過 (エコノカラム, 1×30cm, Bio-Rad) に付し、5% マンニトール水溶液で溶出して精製した。次いでリボソーム溶液を 400,000g、20 分で遠心分離し、沈殿を生理食塩水で再懸濁してリボソーム溶液を調製した。

#### 8. $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームの作製

$^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームは配位子交換反応により作製した。CD を生理食塩水に溶解し 2N NaOH で pH を 11.8 とした 5mM の CD 溶液 1.5ml を、上記の方法で作製したリン脂質の薄膜に添加し、リボソームを調製した後、ゲルろ過で未封入の CD を除去した。得られた精製リボソーム 500  $\mu\text{l}$  を同量の生理食塩水で希釈した後、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO 溶液および  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 溶液 140  $\mu\text{l}$  をこれに加え、37°C で 60 分間インキュベートし、 $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームを得た。反応溶液を遠心分離し沈殿した画分を  $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソーム画分とした。

#### 9. $^{99m}\text{Tc}$ /GSH リボソームの作製

$^{99m}\text{Tc}$ /GSH リボソームは従来の方法に準じて調製した。GSH を 135mM NaCl/10mM HEPES buffer (pH7.4) に溶かし 2N NaOH で pH=6.7 とし、50mM GSH 溶液を調製した。GSH 溶液 1.5ml をリン脂質の薄膜に添加し、リボソームを調製した後、ゲルろ過で未封入の GSH を除去した。次に  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO 250  $\mu\text{l}$  を精製リボソーム 500  $\mu\text{l}$  に加え、25°C で 40 分間インキュベートし  $^{99m}\text{Tc}$ /GSH リボソームを得た。反応溶液を遠心分離し沈殿した画分を  $^{99m}\text{Tc}$ /GSH リボソーム画分とした。

#### 10. $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームの内容物の分析

$^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO を用いて調製した  $^{99m}\text{Tc}$ -CD リボソーム ( $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-CD リボソーム) および  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 を用いて調製した  $^{99m}\text{Tc}$ -CD リボソーム ( $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20-CD リボソーム) の各沈殿画分に、およそ 250kBq/ml となる量のエタノールを加え十分に

攪拌し、20 分静置して脂質膜を溶解した。溶出させたリポソーム内容物を EP によって分析した。

### 1.1. 正常マウスにおける体内動態

$^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リポソーム画分あるいは  $^{99m}\text{Tc}$ /GSH リポソーム画分をリン脂質濃度  $1.4\sim 1.8\ \mu\text{mole/ml}$  となるように生理食塩水で希釈した。それぞれのリポソーム溶液  $0.1\text{ml}$  を一群 5 匹で 5 週令の ddY 系雄性マウスの尾静脈より投与した。投与 10 分、1、3、6、24 時間後に断頭によって屠殺した後、各組織を摘出し、臓器重量ならびに放射能を  $\gamma$  線検出装置で測定した。各臓器に分布した放射能は、投与した量を 100% としたときのそれぞれの臓器  $1\text{g}$  あたりの放射能 (% ID/g tissue) として表した。

投与 24 時間後に、尿中放射能の分析を行った。採取した尿  $300\ \mu\text{l}$  を遠心ろ過用フィルター (Microcon (登録商標), Millipore) に付し  $4^\circ\text{C}$  で  $8800\text{rpm}$ 、15 分間遠心してタンパクを除去した後、 $0.45\ \mu\text{m}$  のシリンジフィルターでろ過したものを EP、RP-HPLC によって分析した。

### (結果)

#### 1. $^{99m}\text{Tc}$ 化合物の化学的性質

$^{99m}\text{TcO}_4^-$  は、EP では  $8.0\text{cm}$  陽極側に泳動し、クロロホルムとメタノールの混合溶媒で展開する TLC では Rf 値は  $0.8$  から  $0.9$ 、50% アセトニトリルで展開する PC では Rf 値は  $0.9$  から  $1.0$  であった。 $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の加水分解によって生じる  $^{99m}\text{TcO}_2$  は、EP、TLC および PC は原点に残存すると考えられる。 $^{99m}\text{Tc}$ -CD は、EP では  $6.0\text{cm}$  陽極側に泳動し、RP-HPLC (B) において  $22.0$  分後に溶出された。 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO は、EP では原点から泳動せず、TLC で Rf 値は  $0.9$  であるため、TLC Rf 値が  $0.9$  付近の放射能の割合から、EP で求められる  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の割合を差し引いた値を放射化学的収率とした。RP-HPLC (A) での保持時間は  $16.9$  分であった。次に示す方法で合成した  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 は、EP では原点から泳動せず、PC では Rf 値は  $0.8$  から  $1.0$

であるため、EP で原点に残存する放射能の割合と、PC で原点に残存する放射能の割合を求めることで、放射化学的収率を算出した。RP-HPLC (A) での保持時間は 18.1 分であった。これらの結果をまとめたもの ( $^{99m}\text{Tc}$  化合物の分析値) を表 1 に示す。

表 1

Table 1.  $^{99m}\text{Tc}$  化合物の分析値

	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{TcO}_2$	$^{99m}\text{Tc-CD}$	$^{99m}\text{Tc-HMPAO}$	$^{99m}\text{Tc-MRP20}$
TLC/ $\text{CH}_3\text{Cl}+\text{MeOH}$ Rf値	0.8-0.9	0	—	—	0.9
PC/ $50\%\text{CH}_3\text{CN}$ Rf値	0.9-1.0	0	—	0.8-1.0	—
EP 泳動距離 (cm)	8.0	0	6.0-8.0	0	0
RP-HPLC (A) 保持時間 (分)	4-5	—	—	18.1	16.9
RP-HPLC (B) 保持時間 (分)	4-5	—	22.0	—	—

## 2. HMPAO および MRP20 の分配係数

オクタノール層に移行した HMPAO の吸光度は検出限界以下であった。MRP20 のオクタノール層の吸光度と水層の吸光度の比は、緩衝液の pH が 7.0 のときに 2.1  $\pm$  0.7、pH が 12.0 のときは 5.0  $\pm$  1.6 であった。

## 3. $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 の合成

通常の操作で MRP20 を  $^{99m}\text{Tc}$  で標識した場合、負電荷を有する加水分解物が 50% 以上生成し、目的標識物の収率は 35~40% 程度にとどまった。そこで、溶媒であるエタノールと塩酸を 6 時間以上窒素ガスで置換し、またスズ・塩酸溶液を少量ずつ反応溶液に加えるようにしたところ、 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 が 81~92% の放射化学的収率で得られた。RP-HPLC (A) による精製後の  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 の放射化学的純度はほぼ 100% であった。

## 4. $^{99m}\text{Tc}$ 錯体の水溶液中での安定性

$^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO と  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 の両錯体溶液を RP-HPLC による精製前と精製後につ



いて、溶液中に存在する各錯体の放射化学的純度の時間変化を調べた。その結果を図4に示す。

未精製の  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO は、錯体形成後 30 分でおおよそ 40% まで分解し、その後の分解は比較的緩やかに進んだ。一方、 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 は、錯体形成後 2 時間でも放射化学的純度はおおよそ 70% であり、25℃において約 40% まで分解が進んだのは 4 時間後であった。精製後については、37℃では 2 錯体の間で安定性に大差は見られなかったが、25℃では逆に  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO の方が  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 よりも安定であった。24 時間後では  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 は 6% まで分解したのに対し、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO の放射化学的純度は 59% であった。

#### 5. $^{99m}\text{Tc}$ 錯体の CD との配位子交換反応性

$^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO と  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 の両錯体を RP-HPLC により精製する前後で、CD との配位子交換反応性に及ぼす pH の影響を調べた結果を図5に示す。

未精製の  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO と CD との交換反応において、混和溶液の pH が上昇するに伴い  $^{99m}\text{Tc}$ -CD の収率は増加し、pH11.9 では収率は 57% であった。また、精製後の交換反応率も pH11.9 で収率は 74% に達した。

$^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 と CD との交換反応性は精製前後とも  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO よりもはるかに高く、測定範囲内の pH では 90% 以上の  $^{99m}\text{Tc}$ -CD 収率を示した。とくに精製後の  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 では、つねに 95% 以上の  $^{99m}\text{Tc}$ -CD 収率を示し、pH による影響は見られなかった。

#### 6. $^{99m}\text{Tc}$ 封入リポソームの作製

$^{99m}\text{Tc}$  を封入したリポソームの遠心後の上清を分取し、沈殿と上清のそれぞれの放射能を測定することで封入効率を求めた。封入効率は沈殿の放射能を沈殿の放射能と上清の放射能の和で除した値とした。 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO を用いた配位子交換反応による  $^{99m}\text{Tc}$ -CD の封入効率は 66.4% であり、 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 を用いた  $^{99m}\text{Tc}$ -CD の封入効率は 70.0% であった。また、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO を用いた GSH リポソームへの封入

効率は 75.1 % であった。

$^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームの内容物を分析した結果を図 6、図 7 に示す。 $^{99m}\text{Tc}$ (HMPAO)-CD リボソーム、 $^{99m}\text{Tc}$ (MRP20)-CD リボソームのどちらの内容物も EP では主要ピークが 7.5cm から 8.0cm 陽極側にあらわれた。しかし、 $^{99m}\text{Tc}$ (HMPAO)-CD リボソームは、内部に存在する放射能のうち、 $^{99m}\text{Tc}$ -CD に相当するピークは 54% にとどまった。それに対して  $^{99m}\text{Tc}$ (MRP20)-CD リボソームの内容物については、EP では 91.1% の放射能が陽極側に 6.5cm 泳動し、RP-HPLC (B) ではほぼすべての放射能が 22.3 分の保持時間で溶出された。

## 7. 正常マウスにおける体内動態

$^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO および  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 を用いて標識した  $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームおよび比較対照となる  $^{99m}\text{Tc}$ /GSH リボソームを正常マウスに静脈投与したときの体内放射能動態を図 8 に示す。三者の血中からの消失は同程度であり、投与早期には肝臓や脾臓への放射能集積に大きな相違が見られなかった。しかし時間経過に伴い、 $^{99m}\text{Tc}$ /GSH リボソームではこれらの臓器への放射能集積の増加が認められ、6 時間後  $^{99m}\text{Tc}$ -CD リボソームとの差は顕著になり、24 時間後においては肝臓は臓器 1g あたり投与放射能の 20% が滞留し、脾臓では 24 時間後も放射能の蓄積傾向が見られ、投与放射能の 56% が残存した。一方、 $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームでは、肝臓の放射能は投与 30 分、脾臓では投与 3 時間を最高値としてその後は経時的に減少した。また、2 種の  $^{99m}\text{Tc}$ -CD リボソームを比較すると、 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20-CD リボソームは  $^{99m}\text{Tc}$ (HMPAO)-CD リボソームに比べ、特に投与 6 時間と 24 時間でより速やかな放射能消失を示した。

投与 24 時間後に体外排泄された放射能量を図 9 に、また尿中放射能を分析した結果を図 10 に示す。投与放射能のうち、尿中排泄された放射能の割合は、 $^{99m}\text{Tc}$ (HMPAO)-CD リボソーム投与群では 59%、 $^{99m}\text{Tc}$ (MRP20)-CD リボソーム投与群では 74% であった。 $^{99m}\text{Tc}$ (MRP20)-CD リボソーム投与後に排泄された尿中放射能は、そのうちの 91.2% が EP で陽極側に 6.0cm 泳動し、RP-HPLC (B) では保持時間 22.5

分後に溶出された。

(考察)

リポソームの $^{99m}\text{Tc}$ 標識法としてもっとも一般的な、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO とグルタチオン内包リポソームによる封入は、高い効率での封入を可能とする。しかし、このような $^{99m}\text{Tc}$ 封入リポソームは $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO の還元的分解物を内包しており、 $^{99m}\text{Tc}$ 化合物が細網内皮系へ蓄積することにより生じる非特異的放射能滞留が、画像精度低下の問題を引き起こす。一方、直接封入による $^{99m}\text{Tc}$ -CD リポソームの作製は、封入効率が著しく低く実用性に劣るが、リポソームに内包される $^{99m}\text{Tc}$ -CD の放射化学的純度は理論的にはほぼ 100%であり、実際にマウス投与後には投与放射能の約 80%が尿中排泄され、速やかな非標的組織からの放射能消失を示すことが先の検討から明らかになっている。画像診断への応用を考慮すると、従来の標識法と同等の高い放射化学的収率ともに、直接封入法に匹敵する高い放射化学的純度を同時に達成する必要がある。

本実施例で、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO または  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 を用いた配位子交換反応により $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リポソームを作製したところ、 $^{186}\text{Re}$ -CD 直接封入時は 3.2%であった封入効率が、66%から 70%と大きく向上した。膜透過性錯体として $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO と  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 のどちらを使用しても、封入効率に大きな違いは見られなかったが、封入後リポソームに内包される $^{99m}\text{Tc}$ -CD の放射化学的純度に顕著な差が認められた。 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 と比較すると、 $^{99m}\text{Tc}$ (HMPAO)-CD リポソーム内の $^{99m}\text{Tc}$ -CD 純度ははるかに低い。これは、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO の加水分解物と思われる、負電荷を有する放射性化合物の生成が原因である。配位子交換反応では、出発原料となる錯体は置換活性が高く比較的不安定である必要があり、そのため目的とする錯体の生成反応は、原料となる錯体の分解反応と競合的に進行する。どちらの反応が優位に進行するかは、原料錯体の安定性に強く依存するが、錯体そのものの安定性だけでなく、リポソーム内配位子濃度も重要な因子であると推測される。HMPAO と MRP20 の分配係数から明らかなように、遊離状態での MRP20 は、HMPAO よりもはる

かに脂溶性が高い。膜外の MRP20 が受動拡散によりリボソーム膜を容易に透過することで、リボソーム内部においても高い遊離 MRP20 濃度を示し、このような過剰な遊離配位子の共存が、錯体の加水分解を受けにくい状態にしている可能性が考えられる。また錯体としての  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 自体が  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO よりも安定性が高いこと（図 4）、また CD との反応性が高い錯体であること（図 5）が示され、これらの要因が CD との配位子交換反応に有利に働き、リボソーム内でも高い純度で  $^{99m}\text{Tc}$ -CD が生成すると考察される。

リボソーム内部の  $^{99m}\text{Tc}$ -CD の放射化学的純度が高いほど、肝臓や脾臓からの速やかな放射能消失が期待できるため、 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20-CD リボソームが従来の  $^{99m}\text{Tc}$  封入リボソームや  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-CD リボソームよりも大幅に肝臓や脾臓での放射能滞留を低減したのは、内部  $^{99m}\text{Tc}$ -CD 純度が投与後の体内放射能分布に大きな影響を及ぼした結果であると考えられる。これは、投与放射能の 74% が尿中排泄され、そのうちの 91% が  $^{99m}\text{Tc}$ -CD の化学形で検出されたことから支持される。以上の結果から、 $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 を用いた配位子交換反応によって、従来問題とされてきた非特異的放射能滞留を低減させる  $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームの、高い放射化学的収率での作製が可能であることが示された。本発明の封入法は高精度画像診断を可能とする  $^{99m}\text{Tc}$  標識リボソームの作製に有用である。また、本発明の封入法は、癌の内用放射線治療を目的とする細胞殺傷性の  $^{186/188}\text{Re}$  標識リボソームの作製においても基礎的知見を与えることが期待される。

#### 産業上の利用の可能性

膜透過性錯体の  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 は、CD との配位子交換反応によって  $^{99m}\text{Tc}$ -CD を高収率で与えることから、本発明による  $^{99m}\text{Tc}$ -MRP20 を用いた配位子交換反応によって、高い放射化学的収率と純度で  $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームを作製することが可能となった。また、本法で作製した  $^{99m}\text{Tc}$ -CD 封入リボソームは、従来問題とされた肝臓や脾臓での非特異的な放射能滞留を大きく低減することが示された。本発明により、 $^{99m}\text{Tc}$  標識リボソームを用いる画像診断精度を向上させることが可能にな

った。また、本発明の方法は、癌の内用放射線治療を目的とする細胞殺傷性の<sup>186/188</sup>Re 標識リポソームの作製にも応用可能である。



## 請求の範囲

1. 短半減期金属放射性核種と  $N$ -[2(1H-ピロリルメチル)]- $N'$ -(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとの錯体と、エチレンジステイン (CD) 封入リポソームとを混合し、インキュベートすることを含む、短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン (CD) との錯体を封入したリポソームの製造方法。
2.  $^{99m}\text{Tc}$ - $N$ -[2(1H-ピロリルメチル)]- $N'$ -(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとエチレンジステイン (CD) 封入リポソームとを混合し、インキュベートすることを含む、 $^{99m}\text{Tc}$ -エチレンジステイン (CD) 錯体封入リポソームの製造方法。
3. 短半減期金属放射性核種と  $N$ -[2(1H-ピロリルメチル)]- $N'$ -(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとの錯体と、エチレンジステイン (CD) 封入リポソームとを混合し、インキュベートすることにより製造される、短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン (CD) との錯体を封入したリポソーム。
4.  $^{99m}\text{Tc}$ - $N$ -[2(1H-ピロリルメチル)]- $N'$ -(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとエチレンジステイン (CD) 封入リポソームとを混合し、インキュベートすることにより製造される、 $^{99m}\text{Tc}$ -エチレンジステイン (CD) 錯体封入リポソーム。
5. 請求項3または4に記載のリポソームを含む、診断剤又は治療剤。
6. 1種類以上のリポソーム形成物質；エチレンジステイン (CD)；エチレンジステイン (CD) 封入リポソーム；短半減期金属放射性核種； $N$ -[2(1H-ピロリルメチル)]- $N'$ -(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミン；または、短半減期金属放射性核種と  $N$ -[2(1H-ピロリルメチル)]- $N'$ -(4-ペンテン-3-オン-2)エタン-1,2-ジアミンとの錯体：から成る群から選択される少なくとも1種類以上の物質を含む、請求項1に記載の短半減期金属放射性核種とエチレンジステイン (CD) との錯体を封入したリポソームの製造方法を行うための試薬キット。
7. 短半減期金属放射性核種が、 $^{99m}\text{Tc}$  またはその塩である、請求項6に記載

の試薬キット。

図 1

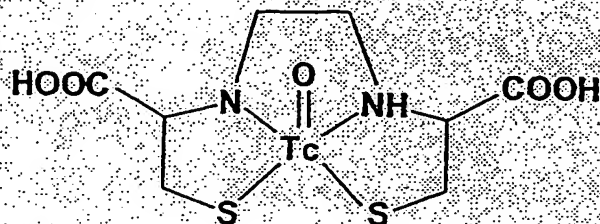
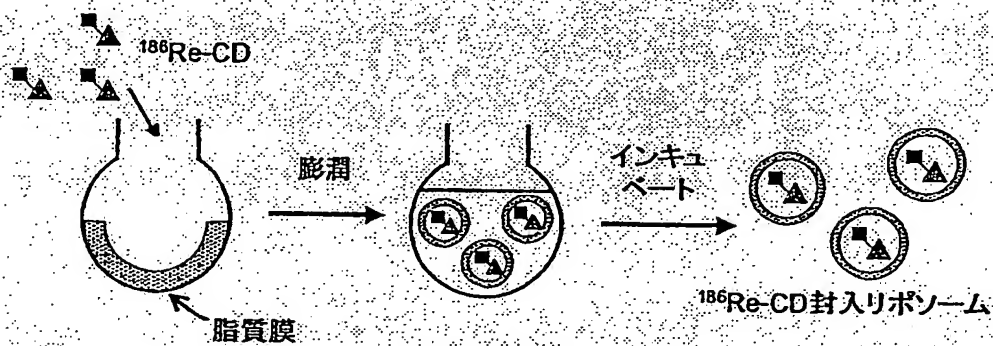


図 2

## (A) 直接封入法



## (A) active loading法

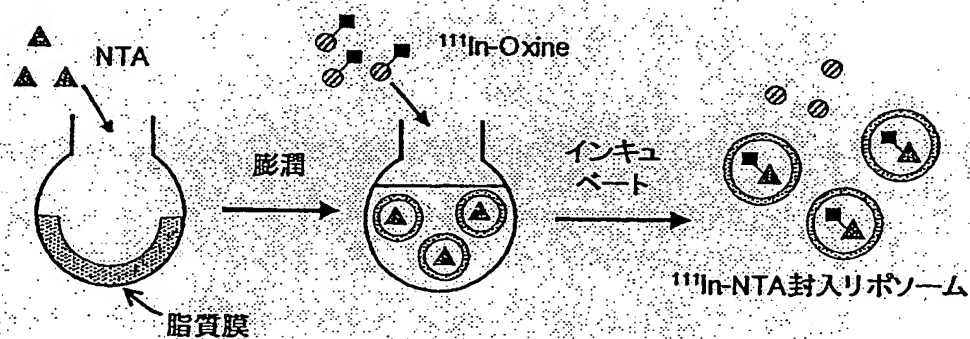


図 3

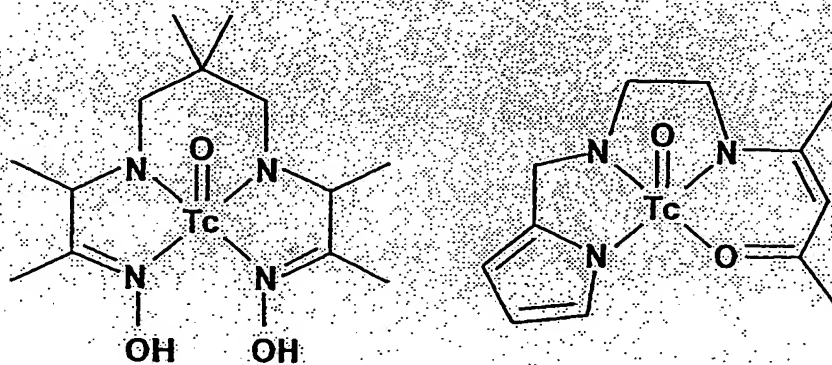




図 4

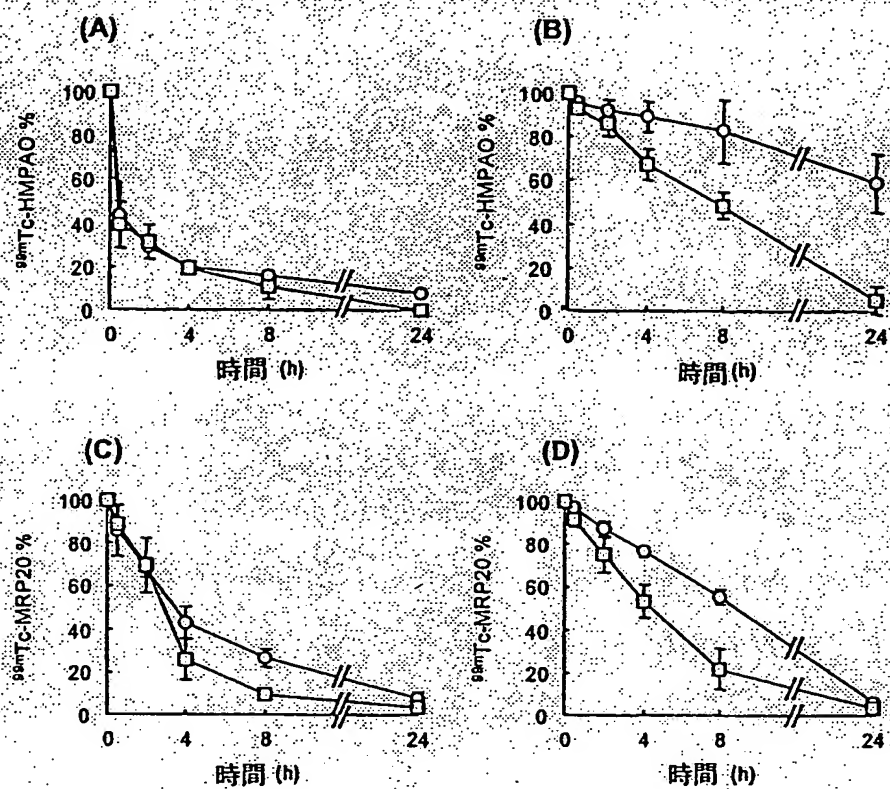


図 5

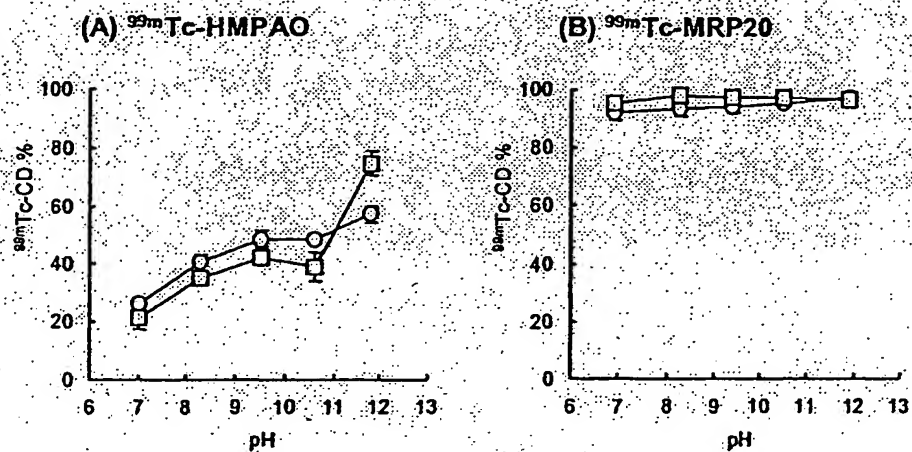


図6

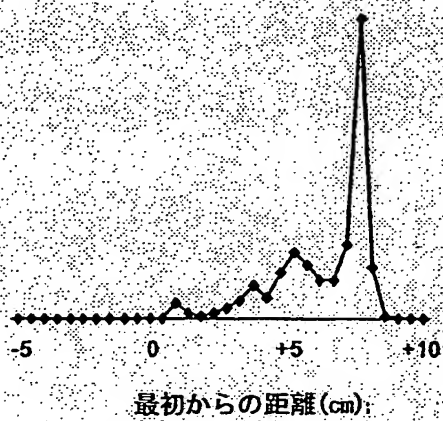
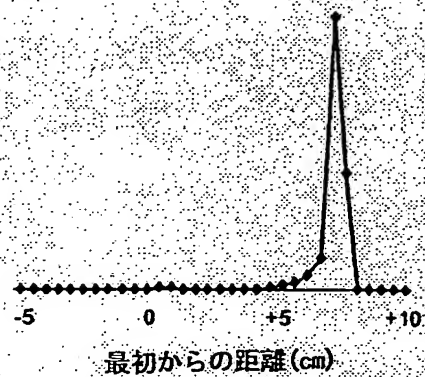


図 7

(A) EP



(B) RP-HPLC

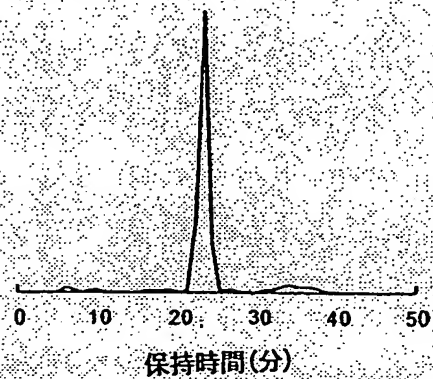


図 8

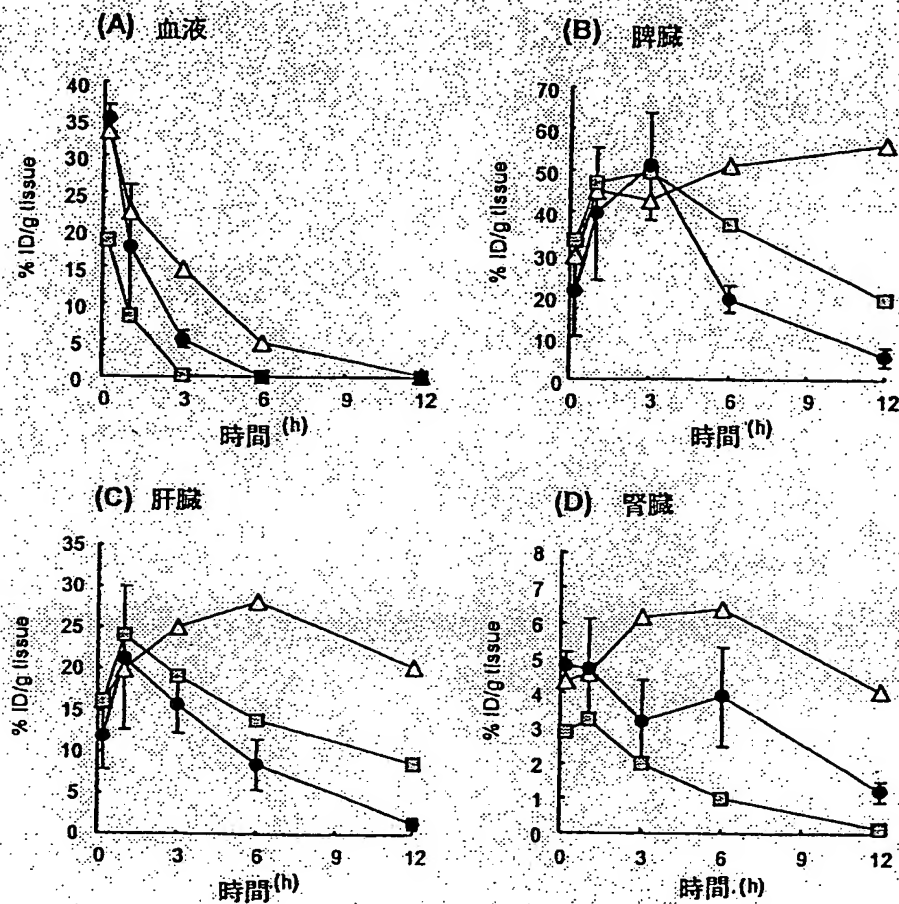




図 9

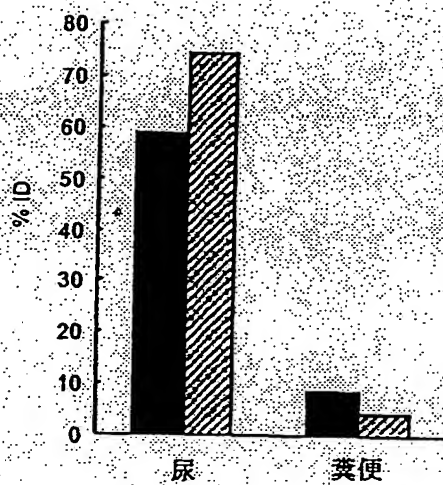
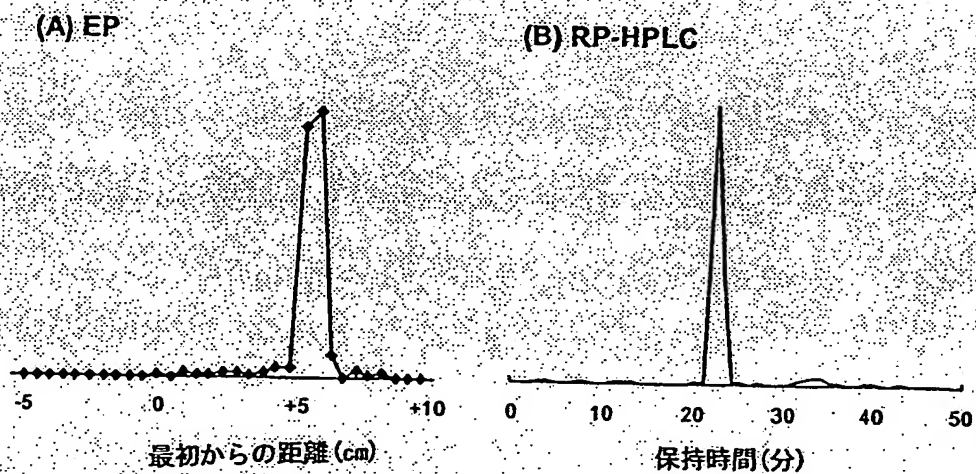


図 10



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02034

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K51/00, 9/127, 47/20, 47/22, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K51/00, 9/127, 47/20, 47/22, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1992 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1996  
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1992 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA(STN), REGISTRY(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PHILLIPS, William T. et al., A simple method for producing a technetium-99m-labeled liposome which is stable in vivo, Nuclear Medicine and Biology, 1992, Vol.19, No.5, pages 539 to 547	1-7
A	KOTHARI, K. et al., Labeling of amine-phenol ligands with technetium-99m by the ligand exchange method, Applied Radiation and Isotopes, 1993, Vol.44, No.6, pages 911 to 915	1-7
A	MORGAN, Gillian F. et al., Technetium-99m-MRP20, a potential brain perfusion agent: in vivo biodistribution and SPECT studies in non-primate animals, Journal of Nuclear Medicine, 1991, Vol.32, No.3, pages 500 to 505	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 15 May, 2003 (15.05.03)

Date of mailing of the international search report  
 27 May, 2003 (27.05.03)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02034

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 444130 A1 (Mallinckrodt, Inc.), 04 September, 1991 (04.09.91), Full text & JP 4-505152 A	1-7

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K51/00, 9/127, 47/20, 47/22, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K51/00, 9/127, 47/20, 47/22, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1992

日本国公開実用新案公報 1971-1992

日本国登録実用新案公報 1994-1996

日本国実用新案登録公報 1996-2003

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	PHILLIPS, William T. et al, A simple method for producing a technetium-99m-labeled liposome which is stable in vivo, Nuclear Medicine and Biology, 1992, Vol. 19, No. 5, pages 539-547	1-7
A	KOTHARI, K. et al, Labeling of amine-phenol ligands with technetium-99m by the ligand exchange method, Applied Radiation and Isotopes, 1993, Vol. 44, No. 6, pages 911-915	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.05.03

国際調査報告の発送日

27.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

岩下 直人

4C

9841

電話番号 03-3581-1101 内線 3451



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MORGAN, Gillian F. et al, Technetium-99m-MRP20, a potential brain perfusion agent: in vivo biodistribution and SPECT studies in non-primate animals, Journal of Nuclear Medicine, 1991, Vol. 32, No. 3, pages 500-505	1-7
A	EP 444130 A1 (Mallinckrodt, Inc.) 1991. 09. 04 全文 & JP 4-505152 A	1-7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**